

## Protocolos Citogenéticos e Perspectivas Biotecnológicas Voltadas à Piscicultura Marinha e Conservação.

Wagner Franco Molina<sup>1</sup> e Uedson Pereira Jacobina<sup>2</sup>

1. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Programa de Pós-graduação em Sistemática e Evolução, Rede Nordeste de Biotecnologia, Brasil. E-mail: molinawf2@yahoo.com.br

2. Universidade Federal do Rio grande do Norte, Brasil. E-mail: jacobina\_up@ufrnet.br

**RESUMO.** Abordagens genéticas passaram a contribuir crescentemente nos programas de criação de peixes e conservação biológica através do emprego de técnicas genéticas clássicas e modernas, envolvendo tanto a manipulação cromossômica, como marcadores moleculares. Entre as abordagens aportadas tem se identificado um crescimento vertiginoso das informações cromossômicas de espécies e populações. Na presente revisão são detalhadas diferentes aplicações e perspectivas dos estudos citogenéticos e da manipulação cromossômica relacionadas à ictiofauna nativa ou cultivada. O cenário apresentado demonstra sua enorme relevância em estudos relacionados à identificação da biodiversidade, embora, em menor grau, a manipulação cromossômica venha sendo corriqueiramente empregada em várias espécies. Apesar da grande biodiversidade marinha e do valor econômico de suas espécies, as informações citogenéticas ainda são significativamente menores e de menor aplicabilidade para a piscicultura marinha.

**Palavras-chave:** citogenética de peixes; cromossomos; piscicultura marinha; manipulação cromossômica

**ABSTRACT:** Cytogenetic protocols and biotechnological prospects focused on aquaculture and marine conservation. Genetic methodologies have been increasingly utilized in fish breeding programs and conservation biology through classical and modern techniques, such as chromosomal manipulation and molecular markers. Among the different approaches have been identified a rapid growth of chromosomal information about species and populations. In this review are detailed the different applications and perspectives of cytogenetic studies and chromosome manipulation related to native or cultivated fishes. The scenario presented demonstrates its enormous importance in studies on the identification of biodiversity, although chromosome manipulation also will be routinely employed in several species. Despite the great marine biodiversity and of the economic value of their species, cytogenetic data is reduced and have been less applicable in the marine fish farming.

**Keywords:** Fish cytogenetics; chromosomes; marine fish farming; chromosome manipulation.

### 1. Recursos pesqueiros e exploração de suas reservas

O conhecimento dos aspectos da biodiversidade nos ecossistemas marinhos é sensivelmente menor em relação ao ambiente terrestre. Apenas 10% da investigação sobre a biodiversidade global têm sido dedicado a estes ecossistemas (HENDRIKS et al., 2006). Isto é particularmente preocupante em face às mudanças globais decorrentes da sobreexploração de recursos naturais e as

alterações climáticas. Estas alterações vêm causando efeitos impactantes em vários ecossistemas importantes ao ambiente marinho, incluindo regiões estuarinas e de recifes de corais (PAULY et al., 2002; HUGHES et al., 2003) gerando efeitos variados sobre as populações de peixes (HENDRIKS et al., 2006). Atrelado a questões ambientais a redução dos estoques pesqueiros naturais está intrinsecamente e perigosamente relacionada à segurança alimentar e ao bem

estar social mundial (CAMARGO; POUEY, 2005). Neste aspecto, a produção pesqueira alcançou seu potencial máximo de extração, sendo incapaz de atender a demanda mundial de forma sustentável. Um terço das reservas mundiais de peixes estão esgotadas ou em fase de recuperação e necessitam de ser reconstituídas (FAO, 2006). Estima-se caso o ritmo de exploração da pesca extrativa marinha se mantenha, que haja um colapso global das atividades de pesca comercial até 2048 (GERAQUE, 2006). Os setores da pesca e aquacultura representam meio de subsistência para 540 milhões de pessoas. Além disto, dependência deste insumo é constatada pelo consumo histórico alcançado em 2010, contabilizando em média de 17 quilos de pescado por pessoa, ou 15% da dieta média de proteínas de origem animal para três bilhões de pessoas (FAO, 2010). Assim, é senso comum que a aquacultura representa a única alternativa futura viável à manutenção do consumo de proteína animal de origem aquática.

Atualmente, a produção da piscicultura marinha está concentrada principalmente no salmão do Atlântico (*Salmo salar*) a espécie cuja produção teve a maior expansão nos últimos anos. Outras espécies que também tiveram aumento significativo de produção foram o robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) e o pargo (*Sparus aurata*) (ALARCON; ALVARES, 1999; ZANUY, 2001).

Um passo importante para o sucesso desta atividade recai na exata compreensão, pelo setor produtivo, das diferenças e perspectivas genéticas que envolvem as populações naturais e estoques cativos de reprodutores. Populações naturais normalmente representam um repositório de ampla base genética da espécie, modelado sob ação da seleção natural, sua manutenção é fonte permanente de germoplasma a ser utilizado para fins de melhoramento genético. Estoques cativos de reprodutores, por outro lado, constituem quase sempre uma amostra genética limitada nem sempre representativo do *pool* gênico das populações ou espécies e completamente dependente do manejo e dos cruzamentos envolvidos para a sua perpetuação.

Desde meados da década de 80, abordagens genéticas passaram a contribuir nos programas de criação de peixes com o emprego de técnicas clássicas e modernas, levando a um crescimento vertiginoso entre outras abordagens, da investigação e aplicações das informações cromossômicas (ARAI, 1997; JACOBINA et al., 2011). De fato, os conhecimentos sobre o cromossomo e marcadores de DNA estão cada vez mais incorporados à aquicultura de forma prática eficiente. Neste sentido, o desenvolvimento de tecnologias de manipulação cromossômica, identificação de sexo cromossômico, criopreservação de gametas, transgênicos e o mapeamento genético, abordagens apoiadas no melhor conhecimento dos cromossomos das espécies e relacionadas ao melhoramento genético de peixes cultivados, têm sido foco de discussões e revisões durante a última década (HULATA, 2001).

A piscicultura marinha vem se desenvolvendo de forma crescente em escala global, contudo em geral enfrenta algumas limitações ao seu pleno desenvolvimento, fatores como baixo conhecimento sobre a biodiversidade de algumas regiões, conhecimento limitado sobre o ciclo de vida de espécies, questões sociais e ambientais e reduzido conhecimento sobre aspectos genéticos das espécies podem se colocar como empecilhos ao seu pleno desenvolvimento (HUTCHINGS, 2001).

Diante da importância da aplicação das informações e protocolos genéticos na aquicultura marinha, aqui é apresentada uma breve revisão sobre os principais empregos e perspectivas do estudo dos cromossomos relacionados à piscicultura marinha.

## 2. Identificação da biodiversidade de espécies e estoques

A citogenética representa o ramo da genética relativo ao estudo dos cromossomos quanto a seus aspectos morfológicos e funcionais, sua variação e evolução. Nas últimas décadas, a citogenética vem se destacando por uma abordagem eficiente na caracterização de grupos naturais, utilizando dados cariotípicos para identificação de espécies (citotaxonomia) e

na elaboração de padrões de relacionamento e ou filogenias (citossistemática). A grande maioria das espécies é cariotipicamente única, diferindo de outras em relação ao número e a morfologia cromossômica e/ou em relação a características estruturais dos seus cromossomos (DIAS; GIULIANO-CAETANO, 2002).

Cerca de 3.425 espécies e sub-espécies já tenham algum nível de informação cromossômica conhecida (ARAI, 2011). Estes dados têm se mostrado ferramenta auxiliar na taxonomia, uma vez que os métodos tradicionais de classificação de espécies com a utilização de análises de caracteres morfológicos estão sujeitos a uma maior variação geográfica ou ambiental (BERTOLLO et al., 1978). Caracteres cromossômicos vêm sendo progressivamente utilizados com sucesso na identificação de espécies crípticas (BERTOLLO et al., 1978; MOREIRA-FILHO et al., 1991), assim como nas relações entre espécies (BRUM; GALETTI, 1997). No que diz respeito aos estudos em peixes, ela têm fornecido importantes subsídios para o melhor entendimento das relações evolutivas entre espécies e populações.

A identificação da biodiversidade é uma etapa fundamental para medidas de conservação dos recursos pesqueiros ameaçados além de contribuir para seu uso sustentável e manejo. Características cromossômicas têm sido relacionadas entre os mais poderosos marcadores genéticos na identificação taxonômica de unidades evolutivas significativas (MORITZ et al., 1996).

Estudos citogenéticos na região Neotropical têm mostrado algumas unidades taxonômicas evolutivas como no caso da espécie nominal *Hoplias malabaricus* que possui sete citótipos em diverge quanto ao número diploide de  $2n=39$  a  $42$  cromossomos, com ocorrência de sistema de cromossomos sexuais simples ou múltiplo, assim como, ausência destes (BERTOLLO et al., 2000). Alguns citótipos mostram ampla distribuição geográfica, enquanto outros parecem ser endêmicos a determinadas bacias hidrográficas. Situações de simpatria e sintopia entre citótipos, sem a

detecção de espécimes com fórmulas cromossômicas híbridas, já foram constatadas em várias localidades, o que reforça a diferenciação existente nesse grupo, sugerindo a inexistência de fluxo gênico entre os citótipos (FERREIRA et al., 1989; SCAVONE et al., 1994; BORN; BERTOLLO, 2006). Diferenças quanto ao número diploide também foram detectadas em *Synbranchus marmoratus* em que o número diploide varia de  $2n=42$  a  $2n=46$ , assim como a presença de tipos diferenciais de hemoglobina tipo I ( $2n=44$  a  $46$ ) e tipo II ( $2n=42$ ) (NAKAMOTO et al., 1986; TORRES, 2000). Uma alta variabilidade na fórmula cariotípica tem sido identificada na espécie *Astyanax scabripinnis*, que também mostra marcada diferenciação relacionada à quantidade e variabilidade de blocos heterocromáticos e sítios Ag-RONs (MOREIRA-FILHO; BERTOLLO, 1991; MANTOVANI et al., 2000).

Neste sentido, estudos citogenéticos se mostram úteis a diferentes propósitos na caracterização de populações e espécies, seja na identificação de polimorfismos (MANTOVANI et al., 2000; PORTO-FORESTI, 2007; MOLINA; GALETTI, 2008), diferenças populacionais sutis (CIOFFI et al., 2009), na detecção de espécies crípticas (MOREIRA-FILHO et al., 1991; VICARI et al., 2008). De forma aplicada, estes dados possibilitam o monitoramento e manejo adequado, visando à conservação e a exploração racional dos estoques pesqueiros.

As informações cariotípicas ainda são incipientes em espécies de peixes marinhos, que representam uma das grandes fronteiras a serem ultrapassadas para expansão da piscicultura comercial em alguns países. Grande parte dos estudos disponíveis tem focado na determinação dos aspectos da macroestrutura cariotípica de variados grupos, entre eles alguns de grande importância para a aquicultura (e.g. JACOBINA et al., 2011). Desta forma, têm sido identificados marcadores citotaxonômicos, sistemas de cromossomos sexuais, cromossomos Bs (supranumerários) e os mecanismos evolutivos envolvidos na sua diferenciação (BRUM, 1996;

MOLINA, 2007; MARTINEZ et al., 2009, entre outros).

Técnicas clássicas de caracterização cromossômica (coloração convencional, Ag-RONs, bandamento C) vêm sendo empregadas na maior parte dos estudos citogenéticos em vertebrados, assim como em peixes. Estes conhecimentos, embora apresentem limitações, tem disponibilizado um conhecimento aplicável a vários fins biotecnológicos, destacando-se a manipulação cromossômica e a obtenção de linhagens poliploides, ginogenéticas, androgenéticas e detecção de híbridos interespecíficos (KOMEN; THOGARD, 2007; PIFERRER et al., 2011).

Devido à possibilidade de variação mesmo entre espécies próximas, as regiões organizadoras nucleolares (RONs) estão entre os marcadores citotaxonômicos mais empregados. As RONs são regiões do DNA responsáveis pela transcrição do RNA ribossômico, frequentemente exibem padrões particulares aos diferentes grupos de peixes, podendo variar no número, localização, intensidade de coloração e tamanho, com diferenças inter-individuais dentro de uma mesma espécie ou mesmo em mosaico, entre células de um mesmo indivíduo. Variações numéricas inter ou intra-individuais no tamanho, localização e no número já foram descritas em vários gêneros. Em alguns grupos, a presença destes sítios em apenas um par de cromossomos é a condição mais frequente. Este padrão já foi observado tanto em famílias dulcícolas como Prochilodontidae (PAULS; BERTOLLO, 1990), Anostomidae (GALETTI et al., 1984), Parodontidae (MOREIRA-FILHO et al., 1985), assim como em espécies marinhas das famílias Carangidae (CAPUTO, 1996), Mugilidae (SOLA et al., 2007), Lutjanidae (ROCHA; MOLINA, 2008), Apogonidae (ARAÚJO et al., 2009), entre outras. Em outros peixes ocorrem NORs múltiplas ou simples, como *Astyanax* (MORELLI, 1981; MOREIRA-FILHO, 1989), *Hoplias* (BORN; BERTOLLO, 2000; VICARI et al., 2003), ou preferencialmente múltiplas como em *Salmo* (MARTÍNEZ et al., 2009).

Um padrão muitas vezes distintivo entre os cariótipos dos peixes reside na distribuição e qualificação da heterocromatina. Regiões heterocromáticas compreendem DNA repetitivo, identificados preliminarmente pelo bandamento C ou por fluorocromos base-específicos. Os cariótipos de muitas espécies de Perciformes tem mostrado uma distribuição da heterocromatina principalmente nas regiões centroméricas e terminal (MOLINA, 2007). Contudo, outros grupos filogenéticos como Characiformes, podem apresentar grandes segmentos heterocromáticos em posição intersticial como em *Astyanax* (MANTOVANI et al., 2000).

Fluorocromos base-específicos vêm sendo empregadas acessoriamente para qualificar as regiões cromossômicas heterocromáticas em peixes. A cromomicina A<sub>3</sub> por exemplo, evidencia blocos ricos em bases GC. Em peixes, as RONs com poucas exceções, apresentam-se como regiões de intensa fluorescência quando submetidos à fluorocromos GC-específicos (SCHWEIZER, 1980). Por outro lado, o DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) forma complexos fluorescentes com o DNA, mostrando especificidade por regiões ricas em bases AT. Segmentos heterocromáticos ricos em bases AT são menos frequentes em peixes podendo, contudo, serem encontrados em algumas espécies (AMENYA; GOLD, 1986). Estes e outros métodos vêm permitindo a identificação da estrutura, organização molecular, o mapeamento de genes específicos, até o comportamento dos cromossomos nas diferentes fases do ciclo celular.

### 3. Mapeamento cromossômico - Hibridação *in situ*

#### *Detecção de sequências repetitivas e teloméricas*

Os DNAs satélites representam uma importante porção do genoma eucarioto composta por diferentes classes de DNA repetitivos, não codificadora e organizada em *tandem*, com unidades de cerca de 100-300 pares de bases (SUMNER, 1990; EPPLER; EPPLER-HAUPT, 2002), que podem estar

dispersas no genoma, ou organizadas em matrizes em *tandem* (CHARLESWORTH et al., 1994).

Unidades de DNAs satélites podem estar presentes de centenas a milhares de cópias em um genoma. Diferentes famílias de DNA satélite têm sido isoladas, caracterizadas e localizadas em cromossomos de diversas espécies, evidenciando uma grande correlação com regiões de heterocromatina constitutiva (JOHN, 1988; LOHE; HILLIKER, 1995). Unidades monoméricas repetidas são comumente detectadas nas regiões centroméricas e teloméricas de alguns ou de vários cromossomos de um determinado organismo, associadas a blocos de heterocromatina constitutiva (TYLER-SMITH; WILLARD, 1993). Além da quantidade e da localização de sequências específicas de DNA satélite variarem grandemente entre espécies distintas, estas muitas vezes mostram-se espécie-específicas, o que sugere não somente uma origem distinta, como também pode ser resultado de um processo evolutivo dinâmico que leva à contínua geração, amplificação, eliminação e substituição de famílias de DNAs satélites (UGARKOVIC; PLOHL, 2002). Embora análises envolvendo DNA repetitivos venham sendo realizadas em um grande número de taxa (LI et al., 2005; BULAZEL et al., 2006), ainda se conhece muito pouco sobre a composição molecular de diferentes tipos de DNAs satélites em alguns grupos de vertebrados, como em peixes. Estudos em diferentes espécies de peixes teleósteos têm demonstrado que repetições de DNA satélite podem ser úteis em estudos filogenéticos (DE LA HERRÁN et al., 2001), para explicitar as relações entre complexos de espécies (Mantovani et al., 2004; VICARI et al., 2008), determinar origens de cromossomos supernumerários (ZIEGLER et al., 2003; ARTONI et al., 2006) e caracterizar cromossomos sexuais (VICENTE et al., 2003; VICARI et al., 2003).

Um novo e grande salto qualitativo das análises cromossômicas tem ocorrido a partir da disponibilização das técnicas de hibridação *in situ*. Estas metodologias que envolvem

sequências alvo e sondas específicas aumentaram a resolução e precisão no mapeamento cromossômico pelo acesso a regiões específicas dos cromossomos, desde genes de cópia simples a unidades repetitivas particulares (KASAHARA, 2009). Além de sequências relacionadas a regiões específicas, podem ser obtidas sondas com a intenção de analisar braços cromossômicos ou cromossomos inteiros. Diante das possibilidades de uso, os procedimentos de FISH abriram maiores perspectivas para a citogenética comparativa, tanto voltada para análises de evolução cromossômica ou detecção de características cariotípicas aplicadas voltadas à produção.

A ampliação de estudos acerca da composição e distribuição de diferentes famílias de DNAs satélites em peixes e outras regiões cromossômicas poderá fornecer maiores contribuições à caracterização genética de diferentes espécies e à compreensão da evolução do genoma dos peixes, com especial foco em domínios de heterocromatina.

#### *Sequências teloméricas*

Os telômeros, regiões particulares encontradas nas extremidades dos cromossomos eucariotos são compostos por repetições da sequência (TTAGGG)<sub>n</sub> DNA e proteínas (SHIPPEN, 1993), com papel importante na estabilização cromossômica prevenindo fusões e degradação (BLACKBURN; SZOSTAK, 1984). Sua estrutura básica e função se mostram conservados ao longo da evolução dos vertebrados (CHEW et al., 2002). Apesar do conservadorismo destas regiões, o tamanho das sequências teloméricas variam de espécie para espécie (MARTINS et al., 2004).

A análise destas regiões são especialmente indicadas na visualização de rearranjos de redução ou aumento cromossômico, sugeridos pela presença de sinais ectópicos intersticiais (REED; PHILLIPS, 1995). Situações deste tipo já foram identificadas em algumas espécies de interesse comercial, como trutas e salmões (ABUÍN et al., 1996) e ciclídeos, como *Oreochromis niloticus* (CHEW et al., 2002). Contudo a não ocorrência de sequências

teloméricas internalizadas em cromossomos que sofreram translocação Robertsoniana tem sido descritos para algumas espécies de peixes (MOLINA; GALETTI, 2002). Este fato já descrito para outros grupos vertebrados não é incomum (MEYNE et al., 1990) e possivelmente é decorrente de perdas durante o processo de fusão ou acúmulo de mutações ou aquisição de elementos repetitivos gerando ausência completa da sequência original ou redução ou ausência de homologia com as sondas limitando sua detecção.

#### 4. Marcadores citotaxonômicos e aspectos funcionais

##### *DNA ribossomal 18S e 5S*

Estudos sobre genes ribossomais têm ganhado destaque em análises citogenéticas ou moleculares em uma ampla variedade de animais e plantas, especialmente na caracterização de espécie e/ou populações/estoques. Em eucariotos superiores, estes genes são organizados em duas famílias multigênicas distintas de repetições em *tandem*, compostas por centenas de milhares de cópias. Uma classe é representada pelo 45S rDNA, unidade transcricional que codifica o 18S, 5,8S e 28S rRNAs, e um espaçador intergênico não transcrito (IGS). Os sítios de DNAr 45S ativos constituem as regiões organizadoras de nucléolos (NORs), que aparecem como constrições secundárias, visíveis como cromatina menos condensada, nos cromossomos metafásicos. As proteínas associadas às NORs transcionalmente ativas são argentofílicas permitindo que estes sítios cromossômicos sejam detectados por reação à prata (SANTORO, 2005).

A outra classe de genes rRNA codificam para o 5S rRNA que consiste de uma sequência altamente conservada de 120pb que é separada de cada unidade transcricional por um espaçador não-transcrito variável (NTS) (LONG; DAVID, 1980). A sequência de genes rRNA são bem conservadas, quando se compara entre os taxa, enquanto os espaçadores não-transcritos mostram grande extensão e variação de sequências, que acredita-se

proporcionar um dinamismo acentuado para os genes rRNA (MARTINS; GALETTI, 2004).

A técnica de FISH com sondas para a família 45S, em peixes, tem sido amplamente empregada para validar polimorfismos de Ag-NORs, resultantes de atividade diferencial de transcrição, assim como decorrentes do número variável de repetições presentes pelo RNAr.

Ao contrário do RNAr 45S, que pode ser identificado pela impregnação com a prata, a localização dos sítios de DNAr 5S é realizado por hibridação *in situ*. O mapeamento de genes RNAr 5S em diversas espécies de peixes tem evidenciado sítios comumente localizados em porção intersticial dos cromossomos, como observado em espécies de salmonídeos e outras famílias (FUJIWARA et al., 1998; MARTINS; GALETTI, 1999; VICENTE et al., 2001).

Na piscicultura a utilização destes marcadores cromossômicos se revela importante na identificação de híbridos interespecíficos como no caso dos tambaquis (*Piaractus mesopotamicus*) e pacus (*Colossoma macropomum*) (FORESTI et al., 1986; ALMEIDA-TOLEDO et al., 1987) e na verificação da ploidia em poliploides induzidos artificialmente como carpa *Cyprinus carpio* (GERVAI et al., 1981), na truta arco-íris *Salmo gairdneri* (REFESTIE et al., 1981) e *Rhodeus ocellatus* (UENO; ARIMOTO, 1982), entre outros.

Marcadores cromossômicos têm revelado a letalidade entre cruzamentos de trutas arco íris (*Onchorhynchus mykiss*) portadores de polimorfismos nas regiões organizadoras de nucléolo, uma vez que rearranjos cromossômicos envolvendo uma inversão pericêntrica ocasionou uma disfunção na síntese de proteínas e consequentemente letalidade no indivíduo portador de tal rearranjo. Neste caso, o indivíduo portador de dois segmentos nucleolares no mesmo cromossomo era uma condição de letalidade (PORTO FORESTI et al., 2004).

#### 5. Aspectos citogenéticos de cruzamentos heteroespecíficos

Na piscicultura, dentre as metodologias de manipulação genética a que mais tem sido

aplicada é a hibridação, que pode envolver o cruzamento entre linhagens da mesma espécie (intraespecífica) ou grupos geneticamente diferentes pelo cruzamento entre espécies separadas (interespecífica). Esta técnica de reprodução visa alcançar características específicas desejáveis ou melhoramento de uma forma geral do desempenho no cultivo. Geralmente, resulta na produção de prole que apresenta um desempenho melhor do que a média de ambas as espécies parentais, conhecido como vigor híbrido ou heterose positiva (BARTLEY et al., 2001)

Até recentemente, análises citogenéticas têm sido consideradas principalmente como uma ferramenta para estudos evolutivos, sendo pouca utilizada no manejo e monitoramento de estoques cultivados. Caso as análises convencionais não sejam suficientes para caracterizar um grupo ou indivíduo sob análise, a identificação pode ser baseada em outros marcadores cromossômicos estruturais derivados de detecção das regiões organizadoras de nucléolo, bandas de replicação pela incorporação da 5-bromodeoxiuridina (5-BrdU), coloração por fluorocromos base-específicos e o mapeamento de sequências específicas com o uso da hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (PORTO-FORESTI et al., 2006).

Métodos citogenéticos apresentam várias vantagens em relação a outros marcadores genéticos. Além do baixo custo, constituem uma forma precisa de se identificar desde níveis de ploidia, à procedência dos complementos cromossômicos dos parentais nos produtos resultantes de hibridação interespecífica (TOLEDO-FILHO et al., 1994). Em alguns casos, o número diploide e morfologia cromossômica são similares, como no caso dos pacus e tambaquis e seus híbridos recíprocos. Por outro lado, híbridos triploides ( $3n$ ) provenientes do cruzamento destas espécies são precisamente detectáveis entre os híbridos interespecíficos gerados (ALMEIDA-TOLEDO et al., 1987). Algumas vezes as espécies parentais apresentam diferentes composições cariotípicas, relacionadas à diferenças no número diploide, fórmula cariotípica e/ou número fundamental, de tal

maneira que, os produtos híbridos podem ser caracterizados pela valor diploide intermediário em relação aos parentais ou diferença morfológica de alguns cromossomos com qualquer das espécies parentais, como em *Colossoma macropomum* e *Mylossoma duriventris* (KOSSOWSKI et al., 1983). Quando híbridos e parentais apresentam o mesmo cariótipo (similaridade numérica e morfológica), torna-se necessário o emprego das metodologias de bandamento cromossômico para identificação de pares marcadores espécie-específicas. O padrão heterocromático dos cromossomos permite a precisa identificação dos parentais e dos híbridos obtidos dos cruzamentos entre o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*) (ALMEIDA-TOLEDO et al., 1987). Resultados práticos similares para identificação de híbridos em peixes tem sido obtidos para diferentes espécies de valor econômico, como em Cipriniformes carpas (ALMEIDA-TOLEDO et al., 1995) e Salmoniformes cultivados (KENDAL et al., 2009).

De fato, a manipulação genética que consiste na junção de genomas evolutivamente diferenciados através da hibridação interespecífica induzida é de grande empregabilidade prática, os resultados obtidos através desta técnica precisam, entretanto, ser parcimoniosamente interpretados, devido às questões de segurança ambiental, pelo risco de introgressão de genes exógenos em populações naturais e quanto a heterogeneidade dos produtos híbridos (RYMAN; UTTER, 1987). A caracterização citogenética dos parentais e a identificação genética de estoques híbridos é um procedimento bastante recomendável para as estações de piscicultura que utilizam essas técnicas no melhoramento animal. Apesar dos riscos à biosegurança ambiental os resultados esperados através das hibridação, reforçam sua utilização em algumas condições diante da possibilidade de manejo adequado aos menor exploração dos estoques naturais, ou práticas favoráveis dos estoques cultivados, produção de indivíduos com características qualitativas diferenciadas ao consumo alimentar, à pesca esportiva e à produção de peixes ornamentais.

## 6. Manipulação cromossômica em peixes marinhos – Casos e perspectivas

O conhecimento prévio dos padrões cromossômicos de uma espécie cultivável abre perspectivas para a implementação e monitoramento de técnicas voltadas à produção de peixes. Entre as possibilidades se destaca a manipulação cromossômica. Metodologias deste tipo vêm sendo empregadas com sucesso em diversas espécies de peixes de grande valor econômico (BEARDMORE et al., 2001; ZANG et al., 2004). A manipulação cromossômica se dá pela interferência física ou funcional nos cromossomos, durante o ciclo celular, por agentes físicos ou químicos. Dois objetivos básicos têm estimulado pesquisas nesta área, o primeiro consiste na manipulação de lotes completos de cromossomos de uma espécie, conhecido como poliploidização, o segundo é a obtenção de indivíduos com genoma de apenas um dos parentais, processos conhecidos como ginogênese (genoma materno preservado) ou androgênese (genoma paterno preservado).

Poliploides podem ser definidos como organismos com um ou mais conjuntos de cromossomos adicionais com relação ao número mais frequentemente encontrados na natureza para uma determinada espécie. Poliploidia tem sido envolvido na especiação de animais e principalmente em plantas (HEGARTY; HISCOCK, 2007). Nos peixes este mecanismo parece ter surgido extensivamente, de forma independente, várias vezes durante a sua evolução, com maior incidência nos grupos mais primitivos (LEGATT; IWAMA, 2003). Peixes poliploides induzidos artificialmente vêm sendo usados na aquicultura para alcançar esterilidade ou aumento de produção (DONALDSON; DEVLIN, 1996).

Interações genéticas e epigenéticas entre genes redundantes em peixes poliploides (COMAI, 2005), provavelmente influenciaram o destino da sua evolução, levando à extensa diversidade biológica atual (LE COMBER; SMITH, 2004). A poliploidia está relacionada a evolução de diversos grupos de espécies, como alguns ciprinídeos e cobitídeos (UEDA;

OJIMA, 1978; LUSKOVÁ et al., 2002; VASILEV et al., 2003), bem como alguns outros importantes na aquicultura como os esturjões e salmonídeos (ALLENDORF; THORGAARD, 1984).

Processos de poliploidização espontânea, a partir de alterações meióticas ou mitóticas, têm sido observados em várias ordens filogeneticamente distantes (THORGAARD; GALL, 1979).

O conhecimento do cariótipo de várias espécies de interesse comercial, possibilitou o monitoramento da manipulação de conjuntos cromossômicos durante a indução de alguns processos, como a poliploidização, ginogênese e androgênese. Em peixes essa manipulação compreende, basicamente, a adição ou a subtração de um conjunto completo haploide ou diploide, na meiose ou mitose, respectivamente. Este grupo de organismos oferece vantagens técnicas em relação aos vertebrados superiores, entre elas, a fecundação externa, prolificidade e diferenciação sexual controlável.

A poliploidização consiste na produção de indivíduos com número igual ou superior a três conjuntos cromossômicos haploides completos. Experimentalmente em peixes podem ser produzidos indivíduos com diferentes níveis de ploidia. Poliploides são encontrados espontaneamente em populações selvagens (MOLINA et al., 2007). Com indutores apropriados podem ser facilmente obtidos em muitas espécies comercialmente importantes de peixes (PIFERRER et al., 2009).

Os trabalhos de indução à poliploidia estão direcionados para a obtenção principalmente de indivíduos triploides que frequentemente apresentam alto grau de esterilidade reprodutiva. Esta condição é atribuída à presença do terceiro conjunto de cromossomos, que provoca a interrupção na meiose I na gametogênese, resultando em diferentes níveis de supressão do desenvolvimento gonadal, que neste caso vai depender da espécie e do sexo (WANG et al., 2002). A incapacidade de reproduzir triploides tem sido considerada uma alternativa para as espécies em que a reprodução deve ser



controlada, como nos casos de introdução de espécies exóticas nos ambientes naturais ou com risco de contato com ecossistemas não nativos e em peixes transgênicos (HINDAR et al., 1991; YOUNGSON et al., 2001).

Em salmonídeos, o efeito da esterilidade é desejável por evitar a degradação física e susceptibilidade às doenças relacionadas com a maturação sexual. Desta forma, é possível a continuidade do crescimento durante o período reprodutivo, já que a energia para o metabolismo reprodutivo será canalizada para o crescimento corpóreo. Além disso, a maturação sexual é muitas vezes associado com maior incidência de doenças, ou alterações nas propriedades organolépticas das partes comestíveis, como no caso de muitos salmonídeos. Estes problemas têm sido evitados através da indução a poliploidia, particularmente a triploidia (PIFERRER et al., 2009).

Todas as estratégias utilizadas na obtenção da poliploidia artificial envolvem a interferência na divisão celular durante a meiose ou mitose. A produção de indivíduos triploides, por exemplo, tem sido alcançada através de duas estratégias. A primeira consiste na indução da triploidia diretamente nos ovos, por tratamento físico ou químico, administrado logo após a fertilização. O segundo caminho é através da obtenção de reprodutores tetraploides e posterior cruzamento com indivíduos diploides. Em peixes, esta via é pouco recomendada, pois a sobrevivência dos indivíduos tetraploides é bastante reduzida. Comentários adicionais e aplicações a triploidia podem ser encontrados em alguns trabalhos clássicos como ARAI (2001), FELIP et al. (2001), HULATA (2001), TIWARY et al. (2004) e MAXIME (2008), dentre outros.

Outro objetivo relacionado com a manipulação cromossômica é a produção de linhagens monosexo, obtido através de ginogênese e androgênese. Diferentemente da poliploidia, há modos de perpetuação clonal do genoma de um dos parentais em peixes, tais como a ginogênese. Esta condição é rara na natureza e requer gametas de outro indivíduo para estimular o processo (SCHULTZ, 1980). Um exemplo bem estudado de ginogênese em

meio natural é com a espécie *Poecilia formosa* (SCHARTL et al., 1995), *Carassius auratus gibelio* (CHERFAS, 1981; YAMASHITA et al., 1993) e *Oreochromis niloticus* (CARRASCO et al., 1999).

A ginogênese e androgênese artificial consistem na produção de indivíduos com apenas a informação genética materna ou paterna, respectivamente. Na ginogênese o ovócito é fertilizado por um espermatozoide que foi geneticamente inativado por radiação. Na androgênese o ovócito é irradiado e fertilizado com espermatozoide normal. Em ambos os casos a diploidização pode ser obtida impedindo-se a 1ª divisão mitótica. Algumas espécies comerciais têm tido bastante sucesso na produção de indivíduos ginogenéticos como, por exemplo, na carpa comum, *Cyprinus carpio* (KOMEN et al., 1991).

## 7. Citogenética e genômica de peixes – uma interface

O mapeamento de genomas tornou-se uma ferramenta poderosa para diversos campos de interesse das pesquisas biológicas, entre eles aqueles voltados para a aquacultura (ALCIVAR-WARREN et al., 1997; TONG et al., 2002). Contudo um número muito limitado de espécies teve seu genoma sequenciado (ZHONG et al., 1998; VENKATESH et al., 2000; MARTINS et al., 2004).

No que diz respeito aos peixes, a diversidade no tamanho do seu genoma (quantidade de DNA) tem despertado interesse nas últimas décadas e este progresso vem culminando na construção de mapas genéticos e mapeamentos comparativos, tornando algumas espécies como organismos modelo (TONG; CHU, 2002). Em peixes tanto o tamanho do genoma pode variar muito (0,7-2,7 pg) (CHENG et al., 1993), como existe uma profusa diversidade no número de cromossomos, embora cerca de 50% das espécies mostrem número diploide entre 48 a 50 cromossomos (MANK; AVISE, 2006a).

O conjunto de dados do genoma de diferentes espécies tem permitido examinar sua correlação com diferentes aspectos biológicos das espécies, como o número de cromossomos

(MANK; AVISE, 2006a), o tamanho dos eritrócitos (GREGORY, 2001), tamanho do ovo (HARDIE; HEBERT, 2003), cuidado parental, taxa metabólica, ambiente (HARDIE, HEBERT, 2004), a longevidade (GRIFFITH et al., 2003), a riqueza de espécies (MANK; AVISE, 2006b; OLMO, 2006) e risco de extinção (VINOGRADOV, 2004a).

Embora o tamanho do genoma dos peixes seja de longe o maior conjunto de dados para qualquer grupo de animais, o conhecimento das causas e consequências da diversidade de conteúdo de DNA neste grupo ainda são preliminares (SMITH; GREGORY, 2009). Apesar disto, algumas inferências sobre a distribuição e o impacto destas diferenças no genoma, entre os peixes, podem ser divisadas, como por exemplo, que os genomas de peixes de água doce são maiores do que os dos peixes marinhos (HARDIE; HEBERT, 2004). A nível de espécies individuais, parece haver um declínio na variação de tamanho do genoma de acordo com a temperatura. De fato, peixes de clima frio apresentam quantidades mais elevadas de DNA do que espécies subtropicais e tropicais (SMITH; GREGORY, 2009). Correlações entre tamanho do corpo e tamanho do genoma têm sido relatados em alguns invertebrados e podem ser aplicadas a aves e subconjuntos de mamíferos (GREGORY et al., 2001). Em peixes, o tamanho do corpo parece ser inversamente proporcional ao tamanho do genoma, pelo menos quando poliploides não são contados (SMITH; GREGORY, 2009). Assim como, o tamanho do ovo está também associado ao tamanho do genoma em peixes (HARDIE; HEBERT, 2004). Ainda se pode verificar que o número de cromossomos está positivamente correlacionado com conteúdo de DNA entre os peixes, mesmo excluindo a influência de poliploidia (SMITH; GREGORY, 2009).

No que diz respeito aos estudos genômicos aplicados, diversos mapas do genoma, ou seja, a representação da posição dos genes e marcadores de DNA não transcritos sobre cada cromossomo tem sido disponibilizado para espécies cultivadas (TONG; CHU, 2002). Cada grupo de ligação equivale a um a cromossomo. O processo de mapeamento de

um loco sobre um cromossomo depende da formação dos quiasmas durante a meiose. A análise de progênies de cruzamentos experimentais permite identificar a sequência e a distância entre os loci. Se for possível calcular a frequência de recombinação entre os pares de loci é possível construir um mapa de ligação com suas posições sobre os cromossomos. Apesar de algumas dificuldades, como *hotspots* de recombinação em regiões particulares do cromossomo, geralmente a análise de ligação geralmente permite a definição da ordem e distância aproximada dos loci sobre os cromossomos (JONHSON et al., 1996).

O principal objetivo da obtenção de mapas genéticos consiste na possibilidade da identificação e caracterização de QTLs associados com características de interesse econômico, como resistência a determinadas doenças ou ao estresse e seu uso em programas de seleção assistida, voltados a aumentar a eficiência de linhagens geneticamente superiores para produção comercial (TONG et al., 2002).

## 8. Considerações finais

A utilização das técnicas de manipulação cromossômica tem sido cada vez mais incorporada na piscicultura marinha em termos mundiais (ARAI, 2001; TIWARY et al., 2004; MAXIME, 2008). Os aspectos citogenéticos e seus usos aplicados à produção indicam possibilidades de ampla popularização e destacam a eficácia dos cromossomos como indicadores genéticos na piscicultura, seja por meio da caracterização de estoques, diferenciação de linhagens e/ou de híbridos. Tanto as metodologias citogenéticas quanto as genético-moleculares, têm nas suas indicações, vantagens e desvantagens de acordo com os objetivos almejados. Contudo, o uso conjugado destes marcadores (cromossômicos e moleculares) são sinergicamente complementares, enriquecendo a análise e respondendo às questões de forma mais precisa e ampla. É preciso mencionar que os resultados obtidos através desta técnica necessitam ser cuidadosamente interpretados, uma vez que as manipulações cromossômicas pode gerar uma grande heterogeneidade de produtos

manipulados. Aspectos de biossegurança devem ser analisados, tendo em vista os potenciais riscos biológicos que genomas manipulados possam representar ao meio ambiente, entre os quais a possibilidade de competir com as espécies parentais ou ainda de introgressão de genes exógenos em estoques naturais ou cultivados, caso sejam férteis. Assim, a caracterização e a identificação genética de estoques que sofreram manipulação genética constitui um procedimento essencialmente recomendável para programas de piscicultura que utilizam essas técnicas no melhoramento animal. O monitoramento genético de produtos resultantes de processos de hibridação interespecífica objetiva detectar características diagnósticas genéticas, que identifiquem, de maneira clara e acessível, parentais e híbridos.

O crescente acúmulo de dados cromossômicos das espécies de interesse econômico tem suscitado a implementação de novas metodologias biotecnológicas capazes de reverter tanto para a conservação biológica, através do manejo adequado dos estoques naturais e medidas de biossegurança, como no uso aplicado à produção de produtos cultivados diferenciados, capazes de alavancar a patamares mais elevados a atividade de piscicultura, sobretudo a marinha, reduzindo a pressão de captura sobre as populações naturais de espécies economicamente importantes para regiões e países das quais dependem para emprego e renda.

## 9. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq), pela bolsa de produtividade mantida por WFM e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa REUNI disponibilizada para UPJ.

## 10. Referências Bibliográficas

ABUÍN, M.; MARTÍNEZ, P.; SÁNCHEZ, L. Localization of the repetitive telomeric sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> in four salmonid species. **Genome**, v. 39, p. 1035–1038, 1996.  
ALLENDORF, F.W.; LEARY, R.F. Heterozygosity in gynogenetic diploids and triploids estimated by gene-

centromere recombination rates. **Aquaculture**, v. 43, p. 413–420, 1984.  
ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S. A.; BERNARDINO, G.; FERRARI, W.; ALCANTARA, R. C. G. Cytogenetic studies in *Colossoma mitrei*, *Colossoma macropomum* and their interspecific hybrids. In: **Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture**, Berlin, 1987, p. 190–195.  
ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; RAMOS, S. M.; ORMANEZZI, R.; CAROLSFELD, V. J. S.; TOLEDO-FILHO, S. A. Estudos citogenéticos de híbridos entre fêmeas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e machos de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Boletim. CEPTA**, v. 1, p. 1–17, 1988.  
ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; BIGONI, A. P. V.; GERALDO, B.; TOLEDO FILHO, S. A. Chromosomal location of NORs and C bands in F1 hybrids of bighead carp and silver carp reared in Brazil. **Aquaculture**, v. 135, p. 277–284, 1995.  
ARAI, K. The current status of chromosome manipulation in aquaculture. **Suisan Zoshoku in Japanese**, v. 45, p. 411–416, 1997.  
ARAI, K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. **Aquaculture** v. 197, p. 205–228, 2001.  
ARAI, K. **Fish Karyotypes - A Check List**. New York: Springer, 2011.  
ARAÚJO, W. C.; MARTÍNEZ, P. A.; MOLINA, W. F. Mapping of ribosomal DNA by FISH, EcoRI digestion and replication bands in the cardinalfish *Apogon americanus* (Perciformes). **Cytologia**, v. 75, p. 109–117, 2010.  
ARTONI, R.F.; VICARI, M.R.; ENDLER, A.L.; CAVALLARO, Z.I.; JESUS, C.M.; ALMEIDA, M.C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. **Genetica**, v. 127, p. 277–284, 2006.  
BEARDMORE, J. A.; MAIR, G. C.; LEWIS, R. I. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. **Aquaculture**, v. 197, p. 283–301, 2001.  
BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal Genetics**, v. 2, p. 17–37, 1978.  
BERTOLLO, L. A. C.; BORN, G. G.; DERGAM, J. A.; FENOCCHIO, A. S.; MOREIRA-FILHO, O. A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research**, v. 8, p. 603–613, 2000.  
BLACKBURN, E. H.; SZOSTAK, J. W. The molecular structure of centromeres and telomeres. **Annual Review Biochemistry**, v. 53, p. 163–194, 1984.  
BORN, G. G.; BERTOLLO, L. A. C. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus* with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. **Chromosome Research**, v. 8, p. 111–118, 2000.  
BULAZEL, K.; METCALFE, C.; FERRERI, G.C.; YU, J. W.; ELDRIDGE, M. D. B.; O'NEILL, R. J. Cytogenetic and molecular evaluation of centromere-associated DNA sequences from a marsupial (Macropodidae: *Macropus*

- rufogriseus*) X chromosome. **Genetics**, v. 172, p. 1129-1137, 2006.
- BRUM, M. J. I. Cytogenetic studies of Brazilian marine fish. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, p. 421-427, 1996.
- BRUM, M. J. I.; GALETTI Jr. P. M. 1997. Teleostei plan ground karyotype. **Journal of Computational Biology**, v. 2, p. 91-102.
- CAMARGO, S. G. O.; POUEY, J. L. O. F. Aquicultura - um mercado em expansão. **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 11, p. 393-396, 2005.
- CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215-220, 1994.
- CHERFAS, N. B. Gynogenesis in fishes. In: KIRPIČNIKOV, V.S. (Ed.). **Genetic Basis of Fish Selection**. Berlin: Springer verlag, 1981, p. 255-273.
- CHEW, J. S. K.; OLIVEIRA, C.; WRIGHT, J. M.; DOBSON, M. J. Molecular and cytogenetic analysis of the telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> repetitive sequences in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). **Chromosoma**, v. 111, p. 45- 52, 2002.
- CAPUTO, V.; MARCHEGANI, F.; OLMO, E. Karyotype differentiation between two species of carangid fishes, genus *Trachurus* (Perciformes, Carangidae). **Marine Biology**, v. 127, p. 193-199, 1996.
- CIOFFI, M. B.; MARTINS, C.; CENTOFANTE, L.; JACOBINA, U. P.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal variability among allopatric populations of erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs **Cytogenetic and Genome Research**, v. 125, p. 132-141, 2009
- COMAI, L. The advantages and disadvantages of being polyploid. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 836-846, 2005.
- DE LA HERRÁN, R.; RUIZ REJON, C.; RUIZ REJON, M.; GARRIDO-RAMOS, M.A. The molecular phylogeny of the Sparidae (Pisces, Perciformes) based on two satellite DNA families. **Heredity**, v. 87, p. 691-697, 2001.
- DIAS, A. L.; GIULIANO-CAETANO, L. Citogenética de alguns grupos de peixes da bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E., BIANCHINI, E., SHIBATA, O. A., PIMENTA, J.A. (Ed). **Bacia do Rio Tibagi**. Londrina, Paraná: Fundação Araucária, 2002. p. 473 -531.
- DONALDSON, E. M.; DEVLIN, R. H. Uses of biotechnology to enhance production. In: PENNELL, W.; BARTON, B.A. (Ed.), Principles of salmonid culture. **Journal of Aquaculture Research & Development** v. 29, p. 969-1020, 1996.
- EPPLEN, J.F.; EPPLEN-HAUPT, A. Aspects of tandemly organized, repetitive sequences in chromosomal DNA. In: **Some aspects of chromosome structure 80 and function**. SOBTI, R. C.; OBE, G.; ATHWAL R. S. (Ed.). New Delhi: Narosa Publishing House, p. 1-10, 2002.
- FAO. **The state of World fisheries and aquaculture - 2006**. Rome: FAO, 2007.
- FAO. **The state of World fisheries and aquaculture - 2010**. Rome: FAO, 2010.
- FELIP, A.; ZANUY, S.; CARRILLO, M.; PIFERRER, F. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. **Genetica**, v. 111, p. 175-195, 2001.
- FORESTI, F. A. L.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. As regiões organizadoras de nucléolo em peixes. **Ciência e Cultura**, v. 37, p. 448-453, 1985.
- FUJIWARA, A.; ABE, S.; YAMAHA, E.; YAMAZAKI, F.; YOSHIDA, M. S. Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA genes loci and silver stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. **Chromosome Research**, v. 6, p. 463-471, 1998.
- GALETTI Jr., P. M.; FORESTI, F.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Characterization of eight species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar-organizing region. **Caryologia**, v. 37, p. 401-406, 1984.
- GERVAI, J.; PETER, S.; NAGY, L.; HORVATH, L.; CSANYI, V. 1981. Induced triploidy in carp, *Cyprinus carpio*. **Journal of Fish Biology**, v. 7, p. 667-671.
- GRIFFITH, O. L.; MOODIE, G. E. E.; CIVETTA, A. Genome size and longevity in fish. **Experimental Gerontology**, v. 38, p. 333-337, 2003.
- GREGORY, T. R. The bigger the C-value, the larger the cell: genome size and red blood cell size in vertebrates. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 27, p. 830-843. 2001.
- HARDIE, D. C.; HEBERT, P. D. N. The nucleotypic effects of cellular DNA content in cartilaginous and ray-finned fishes. **Genome**, v. 46, p. 683-706, 2003.
- HARDIE, D. C.; HEBERT, P. D. N. Genome-size evolution in fishes. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 61, p. 1636-1646, 2004.
- HEGARTY, M.; HISCOCK, S. Polyploidy: doubling up for evolutionary success. **Current Biology**, v. 17, p. 927-929, 2007.
- HENDRIKS, I.; DUARTE, C. M.; HEIP, C. H. Biodiversity research still grounded. **Science**, v. 312, p. 1715, 2006.
- HINDAR, K.; RYMAN, N.; UTTER, F. Genetic effects of cultured fish on natural fish populations. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 48, p. 945-957, 1991.
- HUGHES T. P.; BAIRD, A.; BELLWOOD, D. R.; CARD, M.; CONNOLLY, S.R.; FOLKE, C.; GROSBERG, R.; HOEGH-GULDBERG, O.; JACKSON, J. B. C.; KLEYPAS, J.; LOUGH, J. M.; MARSHALL, P.; NYSTRÖM, M.; PALUMBI, S. R.; PANDOLFI, J. M.; ROSEN, B.; ROUGHGARDEN, J. Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. **Science**, v. 301, p. 929, 2003.
- HULATA, G. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. **Genetica**, v. 111, p. 155-173, 2001.
- HUTCHINGS, J. A. Influence of population decline, fishing, and spawner variability on the recovery of marine fish. **Journal of Fish Biology**, v. 59, p. 306-322, 2001.
- JACOBINA, U. P.; CIOFFI, M. B.; SOUZA, L. G. R.; CALADO, L. L.; TAVARES, M.; MANZELLA Jr., J.; BERTOLLO, L. A. C.; MOLINA, W. F. Chromosome mapping of repetitive sequences in *Rachycentron canadum* (Perciformes: Rachycentridae): implications for karyotypic evolution and perspectives for biotechnological uses. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. p. 1-8, 2011.
- JOHN, B. **The biology of heterochromatin**. In: VERMA, R. S. (Ed.). Heterochromatin: molecular and structural aspects. New York: Cambridge University Press, 1988.
- KOMEN, H.; THORGAARD G. H. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. **Aquaculture**. v. 269, p. 150-173, 2007.



- KASAHARA, S. **Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados**. 1ª ed. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética. 2009.
- KOSSOWSKI, Q.; BRACAMONTE, N. O.; VELASCO, J. Q. Cariotipo del híbrido de *Colossoma macropomum* (hembra) (Cuvier) 1818 x *Mylossoma duriventris* (macho) (Cuvier) 1818 y sus progenitores. **Acta Científica Venezolana**, v. 34, p. 173-175, 1983.
- LE COMBER, S. C.; SMITH, C. Polyploidy in fishes: patterns and processes. **Biology Journal of Linnean Society**, v. 82, p. 431-442, 2004.
- LEGATT, R. A.; IWAMA, G. K. Occurrence of polyploidy in the fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 13, p. 237-246, 2003.
- LI, Y. C.; CHENG, Y. M.; HSIEH, L. J.; RYDER, O. A.; YANG, F.; LIAO, S. J.; HSIAO, K. M.; TSAI, F. J. C. H.; LIN, C. C. Karyotypic evolution of a novel cervid satellite DNA family isolated by microdissection from the Indian muntjac Y-chromosome. **Chromosoma**, v. 114, p. 28-38, 2005.
- LOHE, A. R.; HILLIKER, A. J. Return of the H-word (heterochromatin). **Current Opinion in Genetics**, v. 5, p. 746-755, 1995.
- LUSKOVÁ, V.; HALAČKA, K.; VETEŠNÍK, L.; LUSK, S. Silver crucian carp *Carassius auratus* in fish assemblages of the area of lower reaches of Dyje river. In: LUSK, S., HALAČKA, K. (Ed.). **Biodiverzita ichtyofauny**, 2002. p. 127-132.
- LONG, E. O.; DAVID, I. D. Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 727-764, 1980.
- MANK, J. E.; AVISE, J. C. Cladogenetic correlates of genomic expansions in the recent evolution of actinopterygian fishes. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 273, p. 33-38, 2006a.
- MANK, J. E.; AVISE, J. C. Phylogenetic conservation of chromosome numbers in Actinopterygian fishes. **Genetica**, v. 127, p. 321-327, 2006b.
- MARTINS, C.; GALETTI Jr., P. M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, v. 7, p. 363-367, 1999.
- MARTINS, C.; WASKO, A. P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: WILLIAMS, C. R. (Ed.). **Focus on Genome Research**, Hauppauge, NY, USA: Nova Science Publishers, 2004. p. 289-318.
- MARTÍNEZ, P.; CASTRO, J.; PARDO, B. G.; BOUZA, C.; HERMIDA, M.; VILAS, R. High Ag-NOR-site variation associated to a secondary contact in brown trout from the Iberian Peninsula. **Genetica**, v. 136, p. 419-427, 2009.
- MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 536-542, 2004.
- MAXIME, V. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. **Fish and Fisheries**, v. 9, p. 67-78, 2008.
- MOLINA, W. F.; GALETTI Jr., P. M. Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis* (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5S rRNA genes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, 373-377, 2002.
- MOLINA, W. F. Chromosomal changes and stasis in marine fish groups. In: PISANO, E.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; KAPOOR, B. G. (Ed.). **Fish Cytogenetics**. Enfield: Science Publishers, p. 69-110, 2007.
- MOLINA, W. F.; SHIBATTA, O. A.; GALETTI Jr., P. M. Chromosomal evidence of population subdivision in the freshwater fish *Leporinus elongatus* in the Upper Paraná River basin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 270-274, 2008.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a specie complex. **Brazilian Journal Genetics**, v. 14, p. 331-357, 1991.
- MOREIRA FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; GALETTI Jr., P. M. Karyotypic studies of some species of family *Parodontidae* (Pisces, Cypriniformes). **Caryologia**, v. 38, p. 47-55, 1985.
- MOREIRA-FILHO, O. **A diversidade no complexo *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): análises citogenéticas e morfológicas**. 99 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1989.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a complex species. **Brazilian Journal Genetics**, v. 14, p. 331-357, 1991.
- MORITZ, C.; WORTHINGTON-WILMER, J.; PODE, L.; SHERWIN, W. B.; TAYLOR, A. C.; LIMPUS, C. J. Applications of genetics to the conservation and management of Australian fauna: four case studies from Queensland. In: SMITH, T. B.; WAYNE, R. K. (Ed.). **Molecular Genetics Approaches to Conservation**, New York: Oxford University Press, 1996.
- OHNO, S. **Evolution by gene duplication**. New York: Springer; 1970.
- OLMO, E. Genome size and evolutionary diversification in vertebrates. **Italian Journal of Zoology**, v. 73, p. 167-171, 2006.
- PAULY, D.; CHRISTENSEN, V.; GUENETTE, S.; PICTHER, T. J.; SUMAILA, U. R.; WALTERS, C. J.; WATSON, R.; ZELLER, D. Towards sustainability in world fisheries. **Nature**, v. 418, p. 689-695, 2002.
- PAULS, E.; BERTOLLO, L. A. C. Distribution of a supernumerary chromosome system and aspect of karyotypic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). **Genetica**, v. 81, p. 117-123, 1990.
- PIFERRER, F.; BEAUMONT, A.; FALGUIÈRE, J. C.; FLAJSHANS, M.; HAFFRAY, P.; LORENZO, L. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. **Aquaculture**, v. 293, p. 125-156, 2009.
- PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G. E.; FORESTI, F. NOR markers in the identification and management of cultured fish species: The case of rainbow trout stocks reared in Brazil. In: PISANO, E.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; KAPOOR, B. G. (Ed.). **Fish Cytogenetics**. Enfield: Science Publishers, p. 333-360, 2007.
- PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; GOMES, E. A.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G.; FORESTI, F. A lethal effect associated with polymorphism of the NOR-bearing chromosomes in rainbow trout (*Oncorhynchus*

- mykiss*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 51-54, 2004.
- REED, K. M.; PHILLIPS, R. B. Molecular characterization and cytogenetic analysis of highly repeated DNAs of lake trout, *Salvelinus namaycush*. **Chromosoma**, v. 104, p. 242-251, 1995.
- ROCHA, E. C.; MOLINA, W. F. Cytogenetic analysis in Western Atlantic snappers (Perciformes, Lutjanidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 461-46, 2008.
- RYMAN, N.; UTTER, F. M. **Population genetics & fishery management**. Seattle: University of Washington Press, 1987.
- SCHARTL, M.; WILDE, B.; SCHLUPP, I.; PARZEFALL, J. Evolutionary origin of a parthenoform, the amazon molly *Poecilia formosa*, on the basis of a molecular genealogy. **Evolution**, v. 49, 827-835, 1995.
- SHIPPEN, D. E. Telomeres and telomerases. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 3, 759-763, 1993.
- SANTORO, R. The silence of the ribosomal RNA genes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, 2067-2079, 2005.
- SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 27 190-193, 1980.
- SOLA, L.; GORNUNG, E.; MANNARELLI, M. E.; ROSSI, A. R. Chromosomal evolution in Mugilidae, Mugilomorpha: an overview. In: PISANO, E.; OZOUFCOSTAZ, C.; FORESTI, F.; KAPOOR, B. G. (Ed.). **Fish Cytogenetics**. Enfield: Science Publishers. p. 165-194, 2007.
- SUMNER, A. T. **Chromosome Banding**. Londres: Unwin Hyman Inc, 1990.
- TYLER-SMITH, C.; WILLARD, H. F. Mammalian chromosome structure. **Current Opinion in Genetics**, v. 3, 390-397, 1993.
- TIWARY, B. K.; KIRUBAGARAN, R.; RAY, A. K. The biology of triploid fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 14, 391-402, 2004.
- THORGAARD, G. H., GALL, G. A. E. Adult triploids in a rainbow trout family. **Genetics**, v. 93, p. 961-973, 1979.
- Thorgaard, G. H.; Scheerer, P. D.; Zhang, J. Integration of chromosome set manipulation and transgenic technologies for fishes. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 1, p. 251-256, 1992.
- TOLEDO-FILHO, S. A.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; BERNARDINO, G. E.; CALCAGNOTTO, D. Monitoramento e conservação genética em projeto de hibridação entre pacu e tambaqui. **Cadernos de Ictiogenética 2**, São Paulo: CCS/USP, 1994.
- UEDA, T.; OJIMA, Y. Differential chromosome characteristics in the funa subspecies (*Carassius*). **Proceedings of the Japan Academy, Ser. B**, v. 54, p. 283-288, 1978.
- UENO, K.; ARIMOTO, B. Induction of triploids of *Rhodeus ocellatus* by cold shock treatment of fertilized eggs. **Experientia**, v. 38, 544-546, 1982.
- VASIL'EV, V. P.; AKIMOVA, N. V.; EMEL'YANOVA, N. G.; PAVLOV, D. A.; VASIL'EVA, E. D. Reproductive capacities in the polyploid males of spined loaches from the unisexual-bisexual complex, occurred in the Moscow river. **Folia Biologica-krakow**, v. 51, 67-73, 2003.
- VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA. A differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 101, p. 24-28, 2003.
- VICARI, M. R.; NOLETO, R. B.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, 173-179, 2008.
- VICENTE, V. E.; JESUS, C. M.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal localization of 5S and 18S rRNA genes in three *Parodon* species (Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, v. 54, 365-369, 2001.
- VICENTE, E. V.; BERTOLLO, L. A. C.; VALENTINI, S. R.; MOREIRA-FILHO, O. Origin and differentiation of a sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G- and C-banding. **Genetica**, v. 119: 115-120, 2003.
- VINOGRADOV, A. E. Genome size and extinction risk in vertebrates. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 271, p. 1701-1705, 2004.
- WANG, S., HARD, J. J.; UTTER, F. M. Salmon inbreeding: a review. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 11, 301-319, 2002.
- YAMASHITA, M.; JIANG, J.; ONOZATO, H.; NAKANISHI, T.; NAGAHAMA, Y. A tripolar spindle formed at meiosis-I assures the retention of the original ploidy in the gynogenetic triploid crucian carp (ginbuna), *Carassius auratus langsdorffii*. **Development Growth and Differentiation**, v. 35, 631-636, 1993.
- YOUNGSON, A. F.; DOSDAT, A.; SAROGLIA, M.; JORDAN, W. C. Genetic interactions between marine finfish species in European aquaculture and wild conspecifics. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 17, 153-162, 2001.
- ZIEGLER, C. G.; LAMTSCH, D. K.; STEINLEIN, C.; ENGEL, W.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. **Chromosome Research**, v. 11, 23-35, 2003.